

ポリオウイルス抗血清の特異性の解析と抗血清存在下の 継代によるウイルス抗原変異の誘起

第I編 ポリオウイルス Mahoney 株抗血清の作製とその特異性の解析

石 沢 文 彦

札幌医科大学衛生学講座 (主任 浦沢正三教授)

Analysis of Specificities of Antisera against Poliovirus and Induction of Antigenic Variation of Poliovirus in the Presence of Homologous Antisera

I. Preparation of Antisera against Poliovirus Mahoney Strain and Analysis of Their Specificities

Fumihiko ISHIZAWA

*Department of Hygiene and Epidemiology, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. S. Urasawa)*

By propagating poliovirus (Mahoney strain) in the presence of equine sera containing poliovirus inhibitors, we prepared previously five different inhibitor-resistant mutants of Mahoney strain origin. In addition, by absorbing anti-Mahoney rabbit serum with these mutants, five monospecific antibodies (HN31, H33, H520, HS77 and HN11 antibodies) showing mutually different specificities in neutralization reaction were isolated.

In the present study, an effort was made to search for new inhibitors with different specificity using 425 bovine and 200 equine sera. Further, by examining rabbit antisera prepared against Mahoney strain, an individual difference in the specificity of antiserum, and a sequential change in the composition of antibodies contained in antiserum during the course of immunization were investigated.

1) As a result of screening of animal sera, B1826, a new inhibitory bovine serum differing in its specificity from the previous ones was detected. Then, by absorbing anti-Mahoney serum with the mutant Mahoney strain resistant to this inhibitor (M-B1826), a new monospecific antibody (designated as B1826 antibody) was isolated.

2) Injection into rabbits of relatively small amount of antigen (4×10^6 PFU) resulted in IgM antibody response alone, while immunization with relatively large amount of antigen (6×10^8 PFU or more) could produce IgG as well as IgM antibody.

3) Analysis of the composition of hyperimmune antisera obtained from seven rabbits revealed individual differences in antibody composition; one serum (from R2) contained all of the six monospecific antibodies examined, three (from R5, R6 and R7) contained five monospecific antibodies, two (from R1 and R3) comprised four antibody components and the remaining one (from R4) comprised only three antibodies.

4) These results and the sequential change of antibody composition in antiserum with the advance of immunization indicated that HN31 and H33 antibodies tended to be produced first, followed by B1826, HS77 and HN11 antibodies, while H520 antibody tended to appear last and in small amount.

(Received October 8, 1977 and accepted December 12, 1977)

A. 緒 言

単純なあるいは複雑な抗原性を有する同一抗原の免疫により、免疫後の経過と共に、あるいは用いた動物の種や個

体によって、産生される抗体の反応性に多様性が存在することが知られている^{1,2,40}).

ウイルスに対する免疫に関しては, Regenmortel³⁾ はタバコモザイクウイルスに対して産生された抗体に多様性が

存在することを述べ、また Loo⁴⁾ は同ウイルスを家兎に免疫して経時的に抗血清の反応性を調べることににより抗体の特異性が時間と共に変化していくことを述べている。インフルエンザウイルス⁵⁾、口蹄疫ウイルス⁶⁾、単純ヘルペスウイルス⁷⁾ などについても同様の研究が報告されている。すなわち、これらのウイルスに対する抗血清と抗血清の作製に用いたウイルス株ならび近縁に株との反応性をみると、早期血清と後期血清では特異性が異なり、また同じ IgM あるいは IgG でも免疫早期と後期とはその特異性が異なることが知られている。

一方、人腸内ウイルスの 1 種ポリオウイルスに対して正常動物血清のあるものはウイルス中和活性を有していることが知られており、この活性物質 (Poliovirus inhibitors, 以下インヒビターと省略) は大部分免疫グロブリンと考えられている⁸⁾。Urasawa ら⁹⁾ および Hashimoto¹⁰⁾ はインヒビターを含む動物血清の存在下でポリオウイルス (1 型 Mahoney 株) の増殖を行い、用いたインヒビターに対して中和されないウイルス株 (インヒビター抵抗性株) を多数作製した。これら多数の抵抗性株とその作製に用いたインヒビター血清との交差中和試験の結果、Urasawa ら⁹⁾ は特異性の異なるインヒビターを含む 5 種のウマ血清を選出した。

次いでこれら 5 種のインヒビター血清に対する抵抗性変異株の各々で Mahoney 株抗血清を吸収することにより、インヒビター同様の特異性を有する 5 種類の異なる抗体成分を得た⁹⁾。

本報では以上の成果を基礎とし、1) ウシ血清のスクリーニングによる上記 5 種以外の新たな特異性のインヒビターの検索、2) Mahoney 株の長期免疫で作製した家兎抗血清の特異性の解析に基づく個体による産生抗体の相違、3) 免疫経過に伴う抗血清の組成の変化について検討した成績を述べる。

B. 実験材料および方法

1. ウイルスおよび細胞培養

ポリオウイルス 1 型 Mahoney 株は当教室保存の同株¹¹⁾ を本研究の開始に当たりさらに 3 回 cloning によりブラック純化した。このウイルスを 0.058% グルタミンを含む Eagle's MEM (血清不添加) を培養液とし MS 細胞で 2 回増殖したウイルス感染液を 3 回凍結融解後、低速遠心上清を分注し、 -20°C に保存した。

MS 細胞および HeLa 細胞の培養には血清 5%, グルタミン 0.058% を含む Eagle's MEM を用いた。

免疫用ウイルス抗原には、上述のブラック純化した Mahoney 株ウイルスを HeLa 細胞で 2 回増殖して使用した。

2. plaque assay

直径 70 mm のシャーレに単層培養された MS 細胞を用い、ウイルス各希釈当たり 2 枚のシャーレに各 0.4 ml ずつ接種し、室温 1 時間吸着後、Bacto-agar (1.1%) を含む抗生物質・グルタミン加 Eagle's MEM 8 ml を重層する。炭酸ガスふらん器 (5% CO_2) 中に 37°C 2 日間静置後、0.01% Neutral Red 加二次重層液 (Bacto-agar および抗生物質を含む Eagle's MEM) 4 ml を添加し、 37°C 6~8 時間放置した後、ブラックカウントを行った。

3. 中和試験

100 plaque forming units (PFU) のウイルス液 0.2 ml と、等量の 2 倍階段希釈した血清を混和し、 37°C 1 時間次いで 4°C 18 時間中和した後、前述のごとく plaque assay を行った。

被検混和液のブラック数がウイルス対照のブラック数の 50% の数を示す血清の最終希釈倍数をもって血清のウイルス中和抗体価とした。

4. ポリオウイルス Mahoney 株抗血清の作製

上述のごとくブラック純化した Mahoney 株を HeLa 細胞で 2 回増殖し、その感染培養液を凍結融解して低速遠心の後、上清を $11,000\times\text{G}$, 30 分間遠心した。遠心上清は Halonen and Huebner¹²⁾ の方法に従いフルオロカーボン処理 2 回行った後、 -20°C に保存した (感染価; $1.6\sim 2.4\times 10^9$ PFU/ml)。

免疫には体重 2.3~3.5 kg の家兎を用い、実験開始前に免疫原である Mahoney 株に対する血清中和価が $<4\times$ であることを確認した。家兎は 2 群に分け第 1 群の 5 羽、第 2 群の 2 羽にはそれぞれ Table 1 a および 1 b の計画に従い免疫を施行した。

早期免疫血清については 4×10^6 PFU の感染価を含む 2 ml のウイルス液を 3~5 日間隔で 1~3 回耳静脈より注射するとともに免疫後の採血を行った。

高度免疫血清の作製にあたっては、第 1 群 (R1~5) には各回 6×10^8 PFU の抗原量を、第 2 群 (R6 および 7) には $1.6\sim 2.5\times 10^9$ PFU の抗原量を投与した。最終免疫より 9 日後 (即ち第 1 群では初回免疫後 60 日目、第 2 群では 64 日目) に採血し、血清分離後小分けして -20°C で凍結保存した。なお R1~3 については高度免疫のみを行った。

以上の免疫計画と平行して、免疫期間の前後に同一環境に飼育された 9 羽の非免疫正常家兎より採血し中和抗体価の変動の有無を検討した。

5. 2-Mercaptoethanol (2-ME) 処理

Svehag and Mandel¹³⁾ の方法に準じた。すなわち抗血清と等量の 0.2 M 2-ME を混和して 4°C 24 時間反応させた後、透析した検体量を PBS で原量に補正して、これら

Table 1 *Schedule of immunization into seven rabbits with Mahoney virus*

a. R1-5 (Group I)

	days post-immunization*													
	0	5	10	15	17 (0)	21 (4)	24 (7)	28 (11)	31 (14)	34 (17)	37 (20)	44 (27)	51 (34)	60 (43)
volume and infectivity of immunogen	4×10^6 PFU/2 ml	"	"		6×10^8 PFU/3 ml	"	"	"	"	"	"	"	"	"
days of injection	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
days of bleeding		↑	↑	↑								↑		↑

b. R6 and R7 (Group II)

	days post-immunization												
	0	4	7	11	13 (0)	19 (6)	25 (12)	31 (18)	41 (28)	48 (35)	55 (42)	64 (51)	
volume and infectivity of immunogen	4×10 ⁶ PFU/2 ml		"		1.6×10 ⁹ PFU/ml	"	2.5×10 ⁹ PFU/ml	"	"		"		
days of injection	↓		↓		↓	↓	↓	↓	↓		↓		
days of bleeding		↑		↑		↑	↑			↑		↑	

Neutralizing titers before immunization of all the rabbits (Nos. 1-7) against Mahoney strain were $<4 \times$.

* Days post-immunization indicate days after initial immunization, and the figures in parentheses show days after the initiation of large dose immunization.

を2倍階段希釈して中和活性の測定を行った。対照として抗血清と等量のPBSの混和液を同様に処理し中和活性を測定した。

6. 動物血清

Mahoney株に対するインヒビター検索のための動物血清は正常なウマおよびウシから採血し、 -20°C に凍結保存したものを使用した。

7. インヒビター抵抗性株の作製

詳細は既報⁷⁾にゆずるが、作製方法の大略は以下のごとくである。

Mahoney株 $10^{5.0}$ PFUを等量のウマインヒビター血清と混ぜ 37°C 1時間、 4°C 18時間中和後MS細胞に接種し細胞変性効果(CPE)が発現するまで 37°C で培養を続けた。感染培養液は凍結融解後、同様に6回インヒビター血清による中和とMS細胞での増殖をくり返した。3回cloningによりブラック純化した抵抗株はMS細胞(血清不添加)で2回増殖し、 $11,000 \times G$ 30分間遠心後の上清をさらに $100,000 \times G$ 200分間超遠心して300倍に濃縮した。濃縮ウイルス($10^{10} \sim 10^{11}$ PFU)は次の吸収実験に用いるのに先立ち、15ワットの東芝殺菌燈の下33cmの距離で15分間紫外線照射を行い、ウイルスの抗原性(N抗原)を保持しつつその感染性を殆んど不活化した。

この様にして特異性の異なる5種のウマ血清インヒビターのそれぞれに抵抗性の5種の抵抗性変異Mahoney株(M-HN31, M-H33, M-H520, M-HS77, M-HN11)を作製した。また本報成績中に述べる新たな特異性を有するウシ血清インヒビターに対する抵抗性変異株も同様に(ただしインヒビターによる中和と細胞内増殖は9~10回行った)作製した。

8. 異なる特異性を有する抗体(monospecific antibody)の調製

Mahoney抗血清を各種抵抗性変異株で吸収し、特異性の異なるmonospecific抗体を作製した。方法は既報⁹⁾の通りであるがその大略を以下に記す。Mahoney抗血清1容と上述の軽度紫外線照射により不活化した各種抵抗性変異株の濃縮ウイルス液9容を混和した後、 37°C 1時間次いで 4°C 3日反応させた。反応液の低速遠心後、上清約0.3 mlを3.7 mlの庶糖密度勾配(10~40%)上に重層し、RPS40ローターを用い、35,000 rpm 3時間(日立55P)遠心した後、検体表面より0.5 mlずつ分画採取し、各分画中の非反応性の残存抗体活性を測定した。

吸収に使用したインヒビター抵抗性株、例えばM-HN31で抗血清を吸収して得た抗体は、M-HN31を中和しないがMahoney原株に対する中和活性を有しており、

この様な特異性を有する抗体を HN31 抗体と名づけた。以下同様に、M-H33, M-H520, M-HS77, M-HN11 による抗血清の吸収により、H33 抗体, H520 抗体, HS77 抗体, HN11 抗体を作製した。

対照として抗血清をウイルス液のかわりに PBS で同様に処理して遠心分画を行い、中和活性を測定した。

C. 成 績

I. 新たな特異性を有するインヒビターの検出と

対応する monospecific 抗体の作製

当教室の Urasawa ら⁹⁾により、Mahoney ウイルス中和反応において互いに異なる特異性を有する5種類のインヒビター (HN31, H33, H520, HS77, HN11) の存在が確認されている。以上は全てウマ血清由来のインヒビターであるが、抗血清中に含まれている抗体成分の特異性をより詳細に検討するために新たな特異性のインヒビターの検出とその抵抗性変異株の作製が必要とされたため、主としてウシ血清について先ずこの点を検討した。

北海道各地より採取した425頭のウシ血清および200頭のウマ血清について、10倍血清希釈でスクリーニングを行い Mahoney 株のブラック数を10%以下に減少させる高い活性を有する84例の血清を選出した。次にこれらの血清について、実験材料および方法欄に記した5種類のインヒビター抵抗性変異株と特異性の異なる5種類の抗体成分に同時抵抗性の変異株¹⁴⁾ (M-HN31 ab-H33 ab-H520 ab-HS77 ab-HN11 ab) を用いてその中和価を測定した。その結果、用いた6変異株と Mahoney 原株を同様に強く中和する (中和価: $\geq 512 \times$) 7血清が得られたため、以下これらの血清を用いてそれぞれに対する抵抗性変異株を作製した。現在までに3株の変異株 (M-B1826, M-B1927, M-HS70) が得られているが、その1つ M-B1826 株は従来の5変異株と異なる新しい変異株と考えられた。

以下 M-B1826 株の性状を簡単に示す。Table 2 は Mahoney 抗血清を従来の5変異株で吸収して得た5種類の抗体と従来の5変異株ならびに M-B1826 株間の交差中和試験の成績を示しているが、M-B1826 株はいずれの特異抗体によっても Mahoney 株同様に中和されている。そこで次に本ウイルスを用いて、Mahoney 抗血清を吸収し、吸収されずに残存する抗体の特異性をみると Table 3 のごとくで、この様にして得られた B1826 抗体 (Mahoney 抗血清を M-B1826 株で吸収した残存抗体を既報⁹⁾ の命名に従い、B1826 抗体と名づける) は吸収に用いた M-B1826 以外の株を同程度に中和している。以上の Table 2 および3の成績は B1826 抗体がこれまでに得られている5種類の抗体とは異なった特異性を有する抗体であることを示

Table 2 *Cross-Neutralization reaction of newly prepared M-B1826 mutant and other inhibitor-resistant mutants of Mahoney strain origin with five monospecific antibodies*

Virus strains tested	monospecific antibody				
	HN31ab*	H33ab	HS77ab	HN11ab	H520ab
Mahoney	128	128	64	64	16
M-HN31	<4	128	64	64	8
M-H33	128	<4	16	32	8
M-HS77	128	64	<4	64	16
M-HN11	64	128	64	<4	8
M-H520	128	128	32	64	<4
M-B1826	128	256	64	64	16

Numerals show neutralizing antibody titers.

* HN31ab, etc.; HN31 antibody, etc.

Table 3 *Neutralization reaction of B1826 antibody with original Mahoney and its inhibitor-resistant strains*

Virus strains	B 1826 antibody*
Mahoney	128
M-HN31	128
M-H33	256
M-HS77	256
M-HN11	128
M-H520	128
M-B1826	<4

* This antibody was obtained by absorption of Mahoney antiserum (R2) with M-B1826 strain. Numerals show neutralizing antibody titers.

し、従って M-B1826 株は従来のものとは異なる新しい変異株と考えられた。なお、新たな特異性を有するインヒビター選出と抵抗性変異株作製の詳細な報告については別の機会にゆずる。

以上の成績に基づき、本報においては M-B1826 株を含む6変異株を用いて抗血清の吸収実験を行い、抗血清中の抗体の構成を検討した。

II. 抗血清の作製と特異性の検討

1. 非免疫対照家兎における中和価の変動

家兎に対する免疫を開始するに先立ち、実験環境内で免疫期間中に免疫原以外の抗原の感作によりポリオウイルスに対する中和価の変動が起るか否かを調べるために、次項に述べる免疫実験の開始約1週間前に体重の等しい9羽の

Table 4 *Changes in serum antibody titers of untreated rabbits kept in the same environment as immunized counterparts during the period of immunization*

	rabbit								
	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16
at the beginning of immunization experiment (Jul. 22th '74)	4	4	4	<4	<4	<4	4	4	<4
at the end of immunization experiment (Sept. 5th '74)	4	8	4	<4	4	<4	4	4	<4

Numerals show neutralizing antibody titers.

家兎より採血し、さらに免疫実験の終了1週間後に採血して血清の中和活性を測定した。

結果は Table 4 に示す通りで、各家兎についての免疫前後の中和価は全て測定誤差の範囲内で一致しており、免疫期間中に中和価を上昇させる様な免疫原以外の因子は働かなかったと考えられる。

2. 免疫の経過と抗体の産生

先に記したごとく、第1群中の2羽R4とR5については比較的少量の抗原量で3回、引き続いて大量の抗原を用いて9回免疫し、この間免疫早期血清として3回、高度免疫血清として2回採血を行った。R1~3は大量抗原の注射のみを行い高度免疫血清のための採血を行った。

第2群は高度免疫血清の力価およびその特異性に対する

抗原量の影響を検討するために設けた群であるが、R6では少量抗原を1回注射、1回採血し、R7では2回注射2回採血を行った。大量抗原による免疫は6回行い、この間4回の採血を行った。

免疫経過中の各時期の血清について中和抗体価を測定した結果を Table 5 a および 5 b に示した。

第1群および第2群の免疫後期血清の抗体価を比較すると、第1群は大量抗原9回接種にもかかわらず4~13万倍の中和価を示し、第2群は6回の接種であるが32万倍に達していることが注目される。第2群の兎に対する各回の接種抗原量は第1群に比し3~4倍多量であり、この様な抗原量の相違が抗体レベルに影響したものと考えられる。

また第1群および第2群を代表する各1羽の家兎 (R5

Table 5 *Neutralizing antibody titers in the course of immunization of seven rabbits*

a, R1-5 (Group I)							
rabbit	days post-immunization						
	pre-	5	15	44 (27)	60 (43)		
R1	<4			3.2×10 ⁴	8×10 ⁴		
R2	<4			1.6×10 ⁴	8×10 ⁴		
R3	<4			1.6×10 ⁴	4×10 ⁴		
R4	<4	1024	8192	3.2×10 ⁴	12.8×10 ⁴		
R5	<4	512 (<8)*	4096 (<8)*	6.4×10 ⁴ (3.2×10 ⁴)*	12.8×10 ⁴		
b, R6 and R7 (Group II)							
rabbit	days post-immunization						
	pre-	4	11	19 (6)	25 (12)	48 (35)	64 (51)
R6	<4	512 (<8)*	—**	3.2×10 ⁴ (1600)*	16×10 ⁴ (8×10 ⁴)*	32×10 ⁴	32×10 ⁴ (32×10 ⁴)*
R7	<4	128	512	6.4×10 ⁴	16×10 ⁴	32×10 ⁴	32×10 ⁴

* Neutralizing titers of R5 and R6 after the treatment with 2-ME are indicated in the parentheses.

** Bleeding not done. For other explanations, see footnotes in Table 1.

および R6) の 2-ME 感受性試験の成績から 4×10^6 PFU 程度の抗原量の注射では 2-ME 感受性の IgM 抗体のみが産生され、 6×10^8 PFU のごとき大量の抗原の注射により始めて 2-ME 抵抗性の (多分 IgG) 抗体が産生されることがわかる。

R6 において大量抗原 1 回注射後 6 日目に採取した血清中の抗体は、大部分が 2-ME 感受性抗体であるが一部に抵抗性の抗体活性も含まれる (2-ME 処理後 $1,600 \times$ の中和活性が残存する) ことから、この時期は IgM 抗体より IgG 抗体産生への移行期に相当すると考えられる。

3. 個体による高度免疫血清中の抗体構成の相違

次に、第 1 群 5 羽、第 2 群 2 羽計 7 羽の家兎から大量抗原による免疫完了の後、最後に採取した血清を用いて各

抗血清中に含まれる抗体の特異性を解析した。すなわち monospecific 抗体調製の際と同様に各抗血清を紫外線照射した各種インヒビター抵抗株で吸収し、蔗糖密度勾配遠心後 0.5 ml づつ分画採取した。Mahoney 原株を用いて各分画の中和活性を測定し、最高およびこれに次ぐ活性を有する分画の中和価の和を求め Table 6 に示した。

一見して明らかなごとく、高度免疫血清中の抗体の構成は家兎の個体により大いに異なり、R2 の抗血清中には特異性の異なる 6 種の中和抗体成分の全てが検出された。それに対して R5, R6, R7 については 6 種の抗体成分のうちいずれか 1 種の抗体成分が検出されず、R1 および R3 は 2 種の抗体成分が、R4 では 3 種の抗体成分が我々の用いた方法で検出不能であった。

Table 6 Composition of monospecific antibodies in sera of seven rabbits after completion of immunization with large dose of Mahoney virus

rabbit	neutralizing antibody titers against Mahoney strain						
	whole serum	HN31ab.*	H33ab.	HS77ab.	HN11ab.	H520ab.	B1826ab.
R1	8×10^4	384	128	32	<8	<8	40
R2	8×10^4	1536	1024	320	144	16	384
R3	4×10^4	128	128	<8	24	<8	16
R4	12.8×10^4	256	576	<8	<8	<8	40
R5	12.8×10^4	768	640	40	80	8	<8
R6	32×10^4	40	576	64	<8	8	80
R7	32×10^4	512	12	16	256	<8	16

A 0.03 ml of serum absorbed with 0.27 ml of each inhibitor-resistant Mahoney strain was fractionated by sucrose density gradient centrifugation, and the neutralizing titer of unabsorbed antibody (monospecific antibody) was measured using the original Mahoney strain.

* HN31ab., etc.: HN31 antibody, etc.

また調べた 7 羽の家兎抗血清が各特異抗体を含有する頻度をみると、HN31 抗体および H33 抗体は全ての抗血清に含まれ、B1826 抗体は R5 を除く全ての抗血清中に、HS77 抗体は 7 羽中 5 羽に、HN11 抗体は 7 羽中 4 羽に、H520 抗体は 7 羽中 3 羽の抗血清にのみその存在が認められた。さらにこの含有頻度に平行して、HN31 抗体および H33 抗体は概してその力価も高く多量の抗体が含まれると考えられたが、B1826 抗体、HS77 抗体、HN11 抗体は前者に比して力価が低く、H520 抗体は含有される頻度が最低であると同時にその力価も最も低い場合が多かった。

免疫に用いた抗原量と抗血清中の特異抗体の構成の間には明瞭な関係はなく、比較的大量免疫された R6, R7 でも特定の抗体の産生が無かったのに対し、比較的小量免疫された第 1 群の中にも非常に多様な抗体を産生したもの (R2) と単純な抗体の構成を示すもの (R4) とがあった。

なお、R2 および R5 については抗血清とインヒビター抵抗株を反応させるかわりに、抗血清にウイルスと同量の PBS を加え、同様に遠心分画を施した対照実験を行った。各分画の中和価を測定した結果、R2 血清で最高の活性を示す 2 分画の中和価の和は 4096、R5 では 8192 となり、Table 6 中の特異性の異なる 6 種の抗体はこれら血清中の全抗体活性のそれぞれ約 50% および 20% を占めると計算されるが、本方法による中和価の測定が 2 倍程度の誤差を含むことを考えると、この値は単なる参考程度とみなすべきであろう。

4. 免疫の経過に伴う抗血清の組成の変化

次に免疫計画の第 1 群および第 2 群に属し、かつ前述 Table 6 の実験成績で比較的多様な抗体を含むことが判明した R5 および R6 の 2 羽の家兎について比較的免疫早期の抗血清中の抗体構成を調べ、免疫の経過に伴う抗血清の

Table 7 *Changes in composition of monospecific antibodies in antisera with time after immunization of two rabbits*

a, the case of R5

	days post-immunization																	
	5						15						60 (43)					
neutralizing titers of sera collected at indicated days	512						4,096						128,000					
serum volumes used for absorption experiment	0.15 ml						0.1 ml						0.03 ml					
monospecific antibodies and their neutralizing titers	HN 31	H 33	HS 77	HN 11	H 520		HN 31	H 33	HS 77	HN 11	H 520	B 1826	HN 31	H 33	HS 77	HN 11	H 520	B 1826
	<4	32	<4	<4	<4		12	320	<8	<8	<8	<8	768	640	40	80	8	<8

b, the case of R6

	days post-immunization																	
	4						19 (6)						64 (51)					
neutralizing titers of sera collected at indicated days	512						32,000						320,000					
serum volumes used for absorption experiment	0.15 ml						0.03 ml						0.03 ml					
monospecific antibodies and their neutralizing titers	HN 31	H 33	HS 77	HN 11	H 520		HN 31	H 33	HS 77	HN 11	H 520	B 1826	HN 31	H 33	HS 77	HN 11	H 520	B 1826
	12	16	<4	8	<4		48	80	<8	80	8	32	40	576	64	<8	8	80

組成の変化について検討した。

R5 は少量抗原 (4×10⁶ PFU) で初回免疫後 (免疫開始 5 日後), および更に同量 2 回追加免疫後 (免疫開始 15 日後) に採血した血清について, R6 は少量の抗原で初回免疫後 (免疫開始 4 日後), および更に大量抗原 1 回注射後 (免疫開始 19 日後) に採血した血清について同様に各種抗体の力価を測定した。

Table 7a および 7b はこれらの成績と Table 6 中の R5 および R6 の最終採血時の血清についての成績を一括表示したものである。R5 では 5 日後の 2-ME 感受性 (前述) の早期血清は H33 抗体のみを含み他の抗体は検出されず, 15 日後の同じ 2-ME 感受性の抗血清中には比較的多量の H33 抗体と共に少量の HN31 抗体が見出された。しかし, さらに大量頻回の追加免疫により抗体の組成は多様化し免疫終了時の抗血清は B1826 抗体を除く 5 種類の抗体の全てを含んでいた。

R6 についてみると, 免疫開始 4 日後の早期血清 (2-ME 感受性) 中に既に HN31, H33, HN11 の 3 種の抗体成分が見出され (血清量不足のため B1826 抗体については検討し得なかった), 大量抗原 1 回免疫後の抗血清 (大部分 2-ME 感受性, 前述) 中には HS77 抗体を除く全抗体の存在が確認された。ただし大量抗原を追加免疫した後, 最終的

に得られた抗血清 (2-ME 抵抗性) の抗体の構成は前者とやや異なり, HS77 抗体の新生がみられた一方, HN11 抗体の活性は消失した。ちなみに免疫後 19 日目の血清中に含まれていた HN11 抗体活性は 2-ME 感受性であった。

本実験においても, HN31 および H33 の両抗体は他の抗体成分に比し, 免疫後比較的早期に出現しかつ高い力価にまで反応する傾向を有することが認められた。

D. 考 察

1. 抗血清を構成する抗体成分

ウイルス粒子の抗原構造に関しては, 種々のウイルスについて多くの研究がなされている。植物ウイルスの 1 種であるタバコモザイクウイルス (TMV) についてはその構造が古くからよく研究されており, 既にその一次構造の決定されたウイルス蛋白構成アミノ酸のうち C 末端の数個が抗原決定基の 1 つとして重要とされている⁴⁾。動物ウイルスについては, この様な詳細な成績は得られていないが, 近年インフルエンザウイルスについては抗血清の吸収実験によりウイルスの抗原性を規定する hemagglutinin 分子上に少なくとも 2 種の異なる抗原決定基 (‘specific’ and ‘common’ determinants) の存在が報告されている¹⁵⁾。また口蹄疫ウイルス (FMDV) について Brown and

Smale¹⁶⁾ は電顕的にウイルス粒子表面に3種の異なる抗体結合部位の存在を示唆している。

TMV など一部の例を除き、ウイルスの抗原性についての多数の研究にもかかわらずその解析が殆んど進んでいない理由として、動物ウイルスの複雑性のためその表面抗原の構造が未だ殆んど不明であること、およびこれに関連して、ウイルスの複雑な抗原を構成する抗原決定基を互に区別する方法がないことがあげられる。我々は、たまたま動物血清中に存在しポリオウイルス抗原の一部と偶然の反応性を有する血清因子 (poliovirus inhibitors) を見出し、これらに対して作製した一連の抵抗性変異ウイルス株を用いることによりこの困難を打開しようと試みた^{9,11)}。

本研究では今までに確認されている6種類のインヒビター抵抗性変異株で家兎 Mahoney 抗血清を吸収することにより、異なる特異性を有する6種類の抗体を得ることができた。また家兎の個体別の検討から、家兎抗血清のあるものはこれら6種の抗体の全てを含み、他は1~3種の抗体を欠如していることが知られた。しかしながら Mahoney 抗血清が最終的に最大何種類の異なる抗体により構成されるかについては明らかでない。前述の R2 および R5 に関する試算により得られた数値 (全抗体活性に対する既知の抗体活性の割合は R2 が50%, R5 が20%) はこれらの抗血清が上記6種類以外にさらに異なる特異性の抗体を含むことを示唆しているとも考えられる。いずれにしても抗血清中に少なくとも6種の抗体が存在する事実は、Mahoney ウイルス表面におけるこれらのそれぞれに対応する抗原決定基の存在を示唆し、Mahoney ウイルスひいては腸内ウイルス全般についてその抗原構造の複雑多様性を示していると考えられる。

2. 免疫原の量と産生される抗体

ポリオウイルスを家兎に免疫して7S IgG 抗体の産生を惹起させるためには、一定量以上の抗原の投与を必要とする。本実験では Mahoney ウイルス抗原の少量免疫 (4×10^6 PFU) では、2-ME 感受性 (IgM) 抗体しか産生されなかったが、大量免疫 (6×10^8 PFU 以上) を施行することにより始めて2-ME 抵抗性の (多分 IgG) 抗体が産生された (類似の大量免疫により作製された抗血清が主として IgG 抗体を含むことは既に確かめられている^{17~19)})。このことは Svehag and Mandel²⁰⁾ の成績を確認したもので、彼等は $10^{6.5}$ PFU 程度のポリオウイルスの1回注射により一過性の19S 抗体の出現をみるが、7S 抗体の産生には少なくとも $10^{7.5} \sim 10^{8.0}$ PFU 程度のウイルス量が必要であると述べている。さらに本研究において、Table 5b に見るごとく大量の抗原を注射された家兎 (R6) の6日目の血清が、 $32,000 \times$ の高力価を示し、その大部分が2-ME 感受性

(19S) 抗体であったのに対し、12日目の血清の中和活性の大部分は2-ME 抵抗性 (7S) 抗体であったが、これは前述の著者らが少量の抗原の免疫では19S 抗体の産生は一過性である (4~5日で止む) が、大量の抗原による免疫では先ず比較的長期間持続する高力価の19S 抗体の産生があり、遅れて7S 抗体が徐々に産生されてくると述べていることに符合する。

3. 免疫の経過と抗血清の特異性

種々のウイルスで動物を免疫した場合、免疫後の時間的経過に伴い抗血清の特異性に变化がみられることが知られている。以下代表的な2,3のウイルスについての研究結果を述べる。

FMDV については、古く Skinner²¹⁾ はウシの感染7日目の血清は免疫に用いたウイルスとは異なる型のウイルスをも同様に中和するが、21日目の血清は型特異的の中和反応を呈することを見出し、Brown and Graves^{22~24)} はO型ウイルスに属する数種の株を用いた実験で、ウシおよびモルモットの早期血清 (19S 抗体) は寒天ゲル内沈降反応および中和反応において免疫原以外の株とも反応するが、21日後の血清では交差反応の程度はかなり低かったと述べている。

これとは逆に、近年 Cowan^{6,25)} はA型ウイルス株 (strain 119) とその変異株を用いた研究で、モルモットの早期 (19S) 抗体はゲル内沈降反応で両者を弁別できたが、後期免疫血清 (7S 抗体) では両者は区別できなかったと報告し、Wagner and Cowan²⁶⁾ は中和反応においてもモルモット19S 抗体は変異株を弁別する能力を有するのに対し、モルモット7S 抗体およびウシ血清中の19S および7S 抗体はその能力を欠いていることを見出している。この現象の説明として、Cowan⁶⁾ はモルモットの7S 抗体と結合するウイルス表面の抗原決定基はさらにいくつかの小さな 'subdeterminant' に分かれ、モルモット19S 抗体はこれらの 'subdeterminant' との反応性を有するため株弁別の能力が高いとしている。

いずれにしても、この様に研究者により異なる結果が得られたことには、各実験に用いられたウイルス株により抗原決定基が異なること、免疫に用いた動物により抗原構造への認識の仕方が異なることなどが関係していると考えられる。

単純ヘルペスウイルス (HSV) については、Hampar らの一連の研究^{27~29)} がある。彼らは1型および2型 HSV で家兎を免疫した実験で、中和反応においては早期 (7日目) IgM 抗体および早期と後期 (7週目) の IgG 抗体に比し、後期血清中に含まれる IgM 抗体がよりよく両型の HSV を弁別でき特異性が高いことを見出している²⁹⁾。同

様に、HSV と構造的に類似したサイトメガロウイルスを家兎に免疫した場合にも 19S 抗体は免疫に用いたウイルス株のみを特異的に中和することが知られている²⁸⁾。これに関連して Miyamoto ら³⁰⁾ および Hampar ら⁷⁾ はフェリチン結合 HSV 抗体を用いた電顕的研究により、早期および後期の IgM 並びに IgG 抗体が異なる virus-associated antigens と反応することを見出しており、後期 IgM 抗体の高い特異性はこの抗体がウイルス表面 (envelope) の株間の相違を反映する構造部分と特異的に反応するためと推測される。

同様に、19S 抗体が 7S 抗体に優る特異性を有するとする成績は、抗原的に類縁の B 群アルボウイルス株に対する家兎抗血清を用い赤血球凝集抑制反応を行った Westaway³¹⁾ の実験においても得られている。

インフルエンザの抗原性ひいてはその血清反応に関しては古くから多くの研究がなされている。Webster³²⁾ は A 型インフルエンザウイルスの抗原部位が単一の抗原決定基より成るとの基本的考えに基づき、免疫早期血清は高い avidity と低い specificity を有する IgM 抗体の大量と、avidity が低く specificity の高い極少量の IgG 抗体を含むのに対し、免疫後期血清中の IgG 抗体は早期 IgM 抗体同様に高い avidity と低い specificity を示すようになることを述べている。Laver ら^{5,15)} はこれに対し A 型インフルエンザウイルス (H3N2) の hemagglutinin 上には少なくとも 2 種の抗原決定基 ('specific' and 'common' determinants) が存在することを証明し、少量の抗原 (A/Port Chalmers/73) の注射では家兎は主に 'specific' determinants に対する抗体を産出し、血清は免疫に用いたウイルス株とのみ反応するのにに対し、大量頻回の注射の後に得られた血清は高力価の 'common' determinants に対する抗体の存在により免疫抗原の Port Chalmers のみならず Hong Kong 株とも強く反応するため両者を区別し難いことを示した。

以上述べた動物ウイルスの研究の多くは免疫早期および後期血清、あるいはその中に含まれる IgM および IgG 抗体の血清学的反応性について検討したものであり、ウイルスの抗原構造に関する (すなわちある特定のウイルス抗原が何個の 'common' および 'specific' determinants より成るかという) 知識に乏しい現在、この様な方法による研究にはおのずから限界があろう。これに対し本報の著者の研究は、ポリオウイルス粒子上に 6 種類の抗原決定基を区別し、免疫の経過に伴うこれらに対する抗体の産生状況を検討したものである。

多様な抗原決定基を含む複雑な抗原に対する免疫反応においては、全ての抗原決定基に対して一斉に免疫応答が起

こるのではなく、そのうちの若干の抗原決定基に対して起こり、いわゆる dominance (優位性) と sequence (順位) の存在することが知られている⁴¹⁾。著者の研究においても (Table 6 と 7) HN31 および H33 両抗体は免疫した全ての家兎で産生され、かつ比較的免疫早期より検出されている。すなわち Mahoney ウイルス粒子表面の HN31 および H33 抗体に対応する抗原決定基はその configuration あるいは特徴的なアミノ酸組成などによって認識され易く抗体を産生し易い傾向を有することが考えられる。

免疫後の経過を追跡した 2 羽の家兎 (R5, R6) については H33 および HN31 抗体が出現した後、漸次他の抗体も産生され、全経過を通じてみると B1826 抗体 (R5) を除き全ての抗体の産生がみられた。この事実は、同一抗原による頻回の免疫を繰り返すうちにウイルス粒子上の比較的認識され難い抗原決定基が次第に認識され、抗体を産生するに至ったものと考えられる。

上述の免疫後の経過に伴う各種ウイルスに対する免疫反応については、報告者によりまた用いたウイルスによりやや異なる成績が得られているが、このことも複雑なウイルス抗原を構成する複数の抗原決定基の免疫応答における 'dominance' によって説明されるかもしれない。ウイルスの株特異性を規定する 'specific' determinants のあるものが抗体産生能の優れたいわゆる 'dominant' な抗原決定基であり、一方 'common' determinants の免疫原性が低いとすると、免疫早期血清は主として免疫原に 'specific' の抗体を含み特異性が高いが、逆に 'common' determinants の抗体産生能が優れていて 'specific' determinants のそれが劣るならば早期血清の特異性は低いという結果になるのであろう。前述の Cowan^{6,25)} による FMDV の実験、Westaway³¹⁾ による B 群アルボウイルスの実験、Laver ら⁵⁾ によるインフルエンザの免疫実験においては早期 (19S) 抗体が概して高い特異性を示しているが、これは前者の可能性を示唆していると考えられる。

過去における我々の教室での結果¹⁷⁾ から判断すると、H33 抗体は Mahoney 株と特異的に反応し、HN11 抗体は広く他の 1 型ポリオウイルス株と反応する傾向がある。すなわち、H33 抗体に対応する抗原決定基は Mahoney 株の 'specific' determinants の 1 つであり、HN11 抗体のそれはいわば 'common' determinants の一部を成すと考えられる。今回の著者の成績では、免疫早期血清のあるもの (R5) は相対的に多量の H33 抗体を含み、従って株特異的と考えられたが、他の家兎 (R6) ではこの様なことはみられなかった。

以上、免疫の経過に伴い抗血清の特異性は必ずしも一定の変化を示すものではなく、用いるウイルス、動物種、ま

た同一の動物種においても個体により異なる反応を呈すると考えるのが妥当であろう。

一方、単純なハプテンに対して産生された抗体についても、一般に早期の血清は affinity が低く、免疫の経過に伴いより affinity の高い抗体の出現してくることが知られている^{1,33)}。本研究において Mahoney ウイルス粒子上の同一抗原決定基に対して産生された抗体についても、免疫グロブリン分子種の相違により、あるいは同一分子種についても免疫の経過により affinity の変化が起っていることが考えられるが、この点については今後の検討に残されている。

4. 抗体産生の個体差

本研究では Mahoney ウイルスという同一抗原による免疫に対して個体により産生される抗血清の組成が異なることが示された。個体により免疫応答に相違を生ずる理由としては、1) 個体による栄養その他の生活環境条件の相違、2) 過去における種々の類縁抗原刺激に対する暴露経験の有無、3) 遺伝的な差異などを挙げることができる。このうち今回の実験では、栄養・飼育条件などは家兎の各個体間で殆んど同一と見なすならば、主として過去の抗原への暴露経験と遺伝上の相違が問題となる。

従来種々の動物血清中にはポリオウイルス不活化物質(インヒビター)の存在することが知られている³⁴⁾。Svehag³⁵⁾は家兎血清中のインヒビターの性状を調べ、その多くが 19S (IgM) 抗体であることを明らかにし、これをポリオウイルスと抗原的に類似した物質により微量ずつ繰り返し感作されることにより産生された抗体であると主張した。この知見に基づき、著者は本研究の開始に当たり、予め多数の家兎より採血し、その血清中和抗体価が検出レベル以下 ($<4\times$) の個体のみを免疫の対象に選定した。すなわち、この操作により免疫に用いた動物が過去に免疫原 (Mahoney ウイルス抗原) と類縁の抗原性物質に暴露された可能性を否定しようと試みた。しかしながら、我々は以前に免疫前の微量の抗体 (中和価 $8\sim 16\times$) の存在が免疫早期の抗体の応答にかなりの影響を与えることを示唆する成績を得ており、故にたとえ現行の測定法で抗体の存在を検出し得なかったとしても、免疫動物が過去において Mahoney 抗原 (多数の抗原決定基より成る) と部分的に交差反応を呈する何らかの抗原刺激に暴露され、その免疫学的記憶を有していた可能性を否定し去ることはできないであろう。

一方、免疫反応における遺伝の影響については近年実験動物を用いて多くの知見が蓄積されつつあり、特定の抗原に対する免疫反応を規定する免疫応答遺伝子 (Ir-gene)^{2,36,37)} の存在も知られている。すなわち、マウスあるいはモルモットでは strain の相違により同一抗原に対してもその認識の仕方が異なり、それぞれ特有の特異性の抗体を産

生することが見出されている。今回実験に用いた家兎は、random breeding の結果個体毎に異なる複雑な遺伝子構成を有すると考えられ、これが同一抗原に対する抗原認識に影響を与え、産生抗体の特異性に影響した可能性は大きいと推測される。

最後に今回の実験で免疫後の経過を追求した家兎の 1 羽 (R6) においては、免疫 19 日後の血清中には HN11 抗体の存在が証明されたが、最終回 (64 日目) に採取した血清中には同抗体は見出されなかった。なお 19 日目血清中の HN11 抗体活性は 2-ME 感受性であった。すなわち、この家兎 (R6) は免疫ウイルス抗原上の HN11 抗体に対応する抗原決定基を認識しこれと反応する 19S 抗体を産生しながら、同抗原決定基に対する 7S 抗体は産生しなかったのではないかと推測される。Grumet³⁸⁾ および Mitchell²⁹⁾ は最近、一定のアミノ酸配列を有する合成ポリペプチド ((T, G)-A-L) に対するマウスの免疫反応を研究し、responder strain (C3H. SW mice) は IgM および IgG 両抗体を産生し、nonresponder (C3H mice) は IgM 抗体のみを産生し IgG 抗体は産生しないことを見ているが、今回の実験における HN11 抗体の産生にも類似の遺伝的機序が関係しているのかもしれない。これらの点の解明については今後の研究にまたねばならない。

E. 結 語

ウマ血清に含まれるポリオウイルスインヒビターの存在下でポリオウイルス Mahoney 株を継代培養することにより、我々は現在迄に 5 種の異なるインヒビター抵抗性 Mahoney 株を作成した。さらにこれらのインヒビター抵抗性 Mahoney 変異株で Mahoney 株抗血清を吸収することにより、中和反応において互いに異なる特異性を有する 5 種類の抗体を単離することに成功した。

本報ではウシ血清についてさらに新たな特異性を有するインヒビターの検索を行うと共に、Mahoney 株を家兎に免疫して得た抗血清を用いて個体による抗血清の特異性の相違の解析、さらに免疫経過に伴う抗血清の組成の変化について検討し以下の結果を得た。

1. ウシ血清のスクリーニングにより、従来の 5 種類のインヒビターと異なる特異性を有する B1826 インヒビターを見出した。次いで本インヒビターに対する抵抗性変異株により Mahoney 株抗血清を吸収して、インヒビター同様の特異性を有する B1826 抗体を作製した。

2. 家兎に Mahoney ウイルスを免疫した場合、比較的少量 (4×10^6 PFU) の抗原投与では IgM 抗体のみが産生され、大量抗原 (6×10^8 PFU 以上) による免疫で初めて IgG 抗体が産生されることを認めた。

3. Mahoney ウイルスを7羽の家兎に大量長期間免疫して得た抗血清の抗体の組成は個体により異なり、ある血清 (R2) は6種の抗体の全てを含んでいたが、3羽の家兎 (R5, R6, R7) より得た血清は6種の抗体のうちいずれか1種の抗体を欠いており、2血清 (R1, R3) は2種の抗体を、残りの1血清 (R4) は3種の抗体を欠如していた。

4. 以上の成績および免疫経過に伴う抗血清の抗体組成の解析から、HN31 抗体と H33 抗体は早期より出現し力価も高く、B1826 抗体、HS77 抗体および HN11 抗体がこれにつき、対し H520 抗体は最も産生され難い傾向が認められた。

これらの成績はポリオウイルスの抗原を構成する抗原決定基の中には抗体を容易に産生し易いものと、し難いものがあるが、頻回の免疫により後者に対する抗体も次第に産生されるに至ることを示唆していると考えられる。

稿を終るに当たり、実験および論文の作成に際し、種々ご教示をいただきました衛生学講座、浦沢价子講師に感謝いたします。

なお、本論文の一部は第22回日本ウイルス学会総会において発表した。

References

- 1) Siskind, G. W. and Benacerraf, B.: Cell selection by antigen in the immune response. *Adv. Immunol.* **10**, 1-50 (1969).
- 2) McDevitt, H. O. and Benacerraf, B.: Genetic control of specific immune response. *Adv. Immunol.* **11**, 31-74 (1969).
- 3) van Regenmortel, M. H. V.: Serological studies on naturally occurring strains and chemically induced mutants of tobacco mosaic virus. *Virology* **31**, 467-480 (1967).
- 4) Loor, F.: On the existence of heterospecific antibodies in sera from rabbits immunized against tobacco mosaic virus determinants. *Immunology* **21**, 557-564 (1971).
- 5) Laver, E. G., Downie, J. C. and Webster, R. G.: Diversity of the antibody response to the different antigenic determinants on the hemagglutinin subunits of influenza viruses. *J. Immunol.* **116**, 336-341 (1976).
- 6) Cowan, K. M.: Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VI, Differences in antigenic determinant site recognition by guinea pig 19S and 7S antibodies. *J. Immunol.* **104**, 423-431 (1970).
- 7) Hampar, B., Miyamoto, K. and Martos, L. M.: Serological classification of herpes simplex viruses. *J. Immunol.* **106**, 580-582 (1971).
- 8) 東 昇, 石田名香雄, 編集: 「新ウイルス学 I」, 5) ウイルス阻止物質 242, 朝倉書店 (1972).
- 9) Urasawa, S., Urasawa, T. and Kanamitsu, M.: Analysis of specificity of antibodies contained in antisera against poliovirus with mutants resistant to inhibitors in equine serum. *J. Immunol.* **113**, 537-542 (1974).
- 10) Hashimoto, N.: Analysis of specificity of poliovirus inhibitors with inhibitor-resistant mutants of a strain of type 1 poliovirus. *J. Immunol.* **115**, 569-574 (1975).
- 11) Urasawa, S., Urasawa, T. and Kanamitsu, M.: Further studies of specificity of antibodies contained in antiserum against poliovirus. *Japan. J. Microbiol.* **20**, 11-16 (1976).
- 12) Halonen, P. and Huebner, R. J.: Preparation of ECHO complement fixing antigens in monkey kidney tissue culture and their purification by fluorocarbon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **97**, 530-535 (1958).
- 13) Svehaug, S. E. and Mandel, B.: The formation and properties of poliovirus-neutralizing antibody. II, 19S and 7S antibody formation: Differences in antigen dose requirement for sustained synthesis, and sensitivity to X-irradiation. *J. Exp. Med.* **119**, 21-39 (1964).
- 14) Urasawa, S., Ishizawa, F. and Urasawa, T.: Antigenic variation of poliovirus caused by antibody components with different specificities. *Microbiol. Immunol.* **21**, 299-307 (1977).
- 15) Laver, E. G., Downie, J. C. and Webster, R. G.: Studies on antigenic variation in influenza virus. Evidence for multiple antigenic determinants on the hemagglutinin subunits of A/Hong Kong/68 (H3 N2) virus and the A/England/72 strains. *Virology* **59**, 230-244 (1974).
- 16) Brown, F. and Smale, C. J.: Demonstration of three specific sites on the surface of foot-and-mouth disease virus by antibody complexing. *J. Gen. Virol.* **7**, 115-127 (1970).
- 17) Kanamitsu, M., Hashimoto, N., Urasawa, S. and Chiba, S.: Studies on poliovirus inhibitors in sera of domestic animals. I, Distributions and properties of poliovirus inhibitors in bovine and equine sera. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* **20**, 471-482 (1967).
- 18) Urasawa, S., Urasawa, T., Chiba, S. and Kanamitsu, M.: Studies on poliovirus inhibitors in sera of domestic animals. III, A comparison of physico-

- chemical properties of poliovirus inhibitors and specific antibodies. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* **21**, 173-183 (1968).
- 19) Urasawa, S. Urasawa, T., Akahonai, Y. and Kanamitsu, M.: Studies on poliovirus inhibitors in sera of domestic animals. IV, Fractionation and identification of poliovirus inhibitors in sera of domestic animals. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* **22**, 87-99 (1969).
 - 20) Svebag, S. E. and Mandel, B.: The formation and properties of poliovirus-neutralizing antibody. I, 19S and 7S antibody formation; Differences in kinetics and antigen dose requirement for induction. *J. Exp. Med.* **119**, 1-19 (1963).
 - 21) Skinner, H. H.: One week old mice as test animals in foot-and-mouth disease research. *Proc. Int. Vet. Cong. 15th (Stockholm)* 195-199 (1953).
 - 22) Brown, F. and Graves, J. H.: Changes in specificity and electrophoretic mobility of the precipitating antibodies present in the serum of cattle recovering from foot-and-mouth disease. *Nature (Lond.)* **183**, 1688-1689 (1959).
 - 23) Brown, F.: A beta-globulin antibody in the sera of guinea pigs and cattle infected with foot-and-mouth disease. *J. Immunol.* **85**, 298-303 (1960).
 - 24) Graves, J. H.: The differentiation of subtypes (variants) of foot-and-mouth disease virus by serologic methods. II, Precipitin test in agar gel. *Am. J. Vet. Res.* **21**, 691-693 (1960).
 - 25) Cowan, K. M.: Immunochemical studies of foot-and mouth disease. V, Antigenic variants of virus demonstrated by immunodiffusion analysis with 19S but not 7S antibodies. *J. Exp. Med.* **129**, 333-350 (1969).
 - 26) Wagner, G. G. and Cowan, K. M.: Immunochemical studies on foot-and-mouth disease. IX, Differences in neutralizing activities of guinea pig and bovine 19S and 7S antibodies. *J. Immunol.* **106**, 656-660 (1971).
 - 27) Hampar, B., Mage, M. G. and Keehn, M. A.: Heterogeneity in the ability of rabbit 7S and 19S neutralizing antibodies to differentiate between intratypic antigenic variants of herpes simplex virus. *J. Immunol.* **101**, 256-261 (1968).
 - 28) Hampar, B., Martos, L. M., Ablaski, D. V., Siguenza, R. F. and Wells, G. A.: Differentiation of cross-reacting simian cytomegalovirus strains by late 19S rabbit neutralizing antibodies. *J. Immunol.* **103**, 1155-1156 (1969).
 - 29) Hampar, B., Martos, L. M., Chakrabarty, M. and Burroughs, M. K.: Late 19S rabbit antibody neutralization test for differentiating herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Immunol.* **104**, 593-598 (1970).
 - 30) Miyamoto, K., Morgan, C. Hsu, K. C. and Hampar, B.: Differentiation by immunoferritin of herpes simplex virion antigens with the use of rabbit 7S and 19S antibodies from early (7-day) and late (7-week) immune sera. *J. Nat. Canc. Inst.* **40**, 629-637 (1971).
 - 31) Westaway, E. G.: Greater specificity of 19S than 7S antibodies on hemagglutination inhibition tests with closely related group B arboviruses. *Nature* **219**, 78-79 (1968).
 - 32) Webster, R. G.: The immune response to influenza virus. III, Changes in the avidity and specificity of early IgM and IgG antibodies. *Immunology* **14**, 39-52 (1968).
 - 33) Steiner, L. A. and Eisen, H. N.: Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J. Exp. Med.* **126**, 1161-1183 (1967).
 - 34) 浦沢正三: エンテロウイルスの伝播と抗体による抗原変異 ウイルス **25**, 213-219 (1976).
 - 35) Svebag, S. E.: The formation and properties of poliovirus-neutralizing antibody. III, Sequential changes in electrophoretic mobility of 19S and 7S antibodies synthesized by rabbits after a single virus injection. *J. Exp. Med.* **119**, 225-240 (1964).
 - 36) Pinchuck, P. and Maurer, P. H.: in "Regulation of the antibody response", 97-113 Thomas, Illinois (1968).
 - 37) Arquilla, E. R. and Finn, J.: Genetic control of combining sites of insulin antibodies produced by guinea pigs. *J. Exp. Med.* **122**, 771-784 (1965).
 - 38) Grumet, F. C.: Genetic control of the immune response. A selective defect in immunologic (IgG) memory in non-responder mice. *J. Exp. Med.* **135**, 110-125 (1972).
 - 39) Mitchell, G. F., Mischell, R. I. and Herzenberg, L. A.: Studies on the influence of T-cell in antibody production. in "Progress in Immunology I, 1st Int. Cong. Immunol. 1971", 323-335 Academic Press, New York (1971).
 - 40) Eisen, H. N.: The immune response to a simple antigenic determinant. in "The Harvey Lectures series 60", 1-34 (1964-65).
 - 41) Sela, M.: Antigenicity: Some molecular aspects. Synthetic antigens help our understanding of immunological phenomena on a molecular level. *Science* **166**, 1365-1376 (1969).